LE CROISEMENT DE DROSOPHILES
DOSSIER CONSEIL

Ce dossier va vous permettre d'apprendre ou de perfectionner les techniques utilisées pour le croisement des drosophiles afin de vous aider à mieux préparer vos travaux pratiques.
Pour réaliser un croisement, il est nécessaire de connaître les caractéristiques de la drosophile, connaître ses besoins (nourriture, température, éclairement…), savoir estimer le temps nécessaire à la réalisation des manipulations et être capable de gérer l'évolution d'une culture en fonction des conditions et du temps.
C'est ce que nous allons tenter de vous apporter à travers ce manuel.

LA DROSOPHILE

La drosophile *Drosophila melanogaster* est depuis longtemps un outil fascinant très utilisé en génétique. Elle permet d'illustrer simplement les notions de dominance et récessivité des allèles.
A l'état sauvage, on la trouve sur les fruits pourris car elle est attirée par la fermentation alcoolique. C'est une petite mouche dont la taille adulte (ailes comprises) n'excède pas 3-4mm. Elle possède des yeux rouge brique et un corps gris.

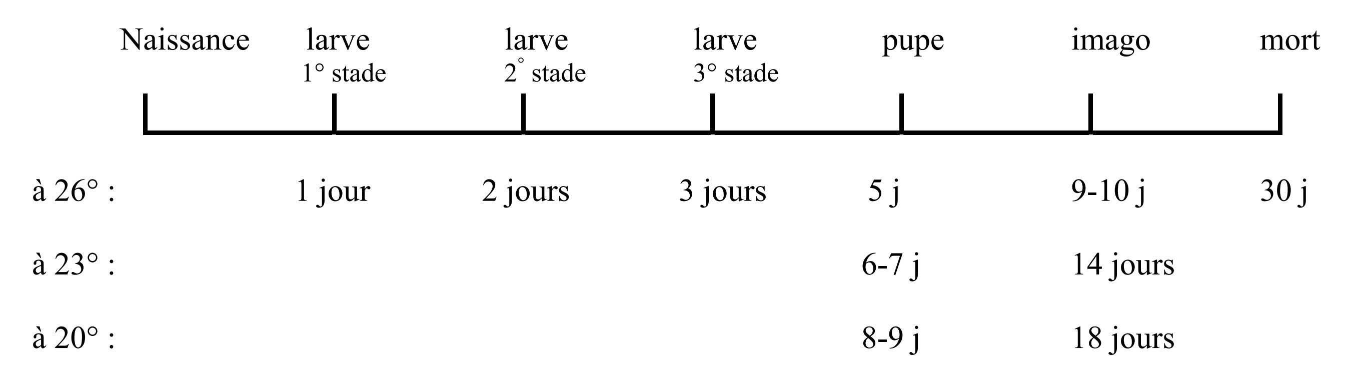
1°) <u>Milieu de culture en laboratoire</u>

Pour 1 litre de milieu :
- 83 g DE FARINE DE MAIS
- 83 g DE LEVURE FISCHER (fermentation)
- 13 g D'AGAR (gélifiant)
- 5 g DE MOLDEX (antifongique)

La composition du milieu est essentielle, elle conditionne la réussite d'une culture. Si le milieu est trop dur (trop d'agar), déshydraté ou contaminé par une bactérie ou une moisissure, la drosophile refusera de pondre estimant que ses larves auront peu de chance de survie dans un milieu défavorable.
Il faut respecter les proportions indiquées ci-dessus et conserver les milieux au réfrigérateur (pas plus d'un mois).
Il est impératif lorsque le milieu est à température ambiante (lors d'une culture par exemple) que l'atmosphère soit humide.

2°) <u>Cycle de la mouche</u>

Voici les différentes étapes du cycle de vie de la drosophile depuis sa naissance jusqu'à la mort, en fonction du temps et de la température :



Ces chiffres sont indicatifs car il existe de plus une variabilité au sein de chaque souche ainsi qu'entre différentes souches et génotypes.
D'une manière approximative, les mouches arrivées au stade pupe-adulte, vont éclore dans une période de :

8 à 20 jours, si elles sont mises à 20°,

4 à 8 jours, si elles sont mises à 26°.
Les mouches vivent environ 3 semaines, cette durée de vie peut être prolongée par une baisse de la température (15° au minimum) jusqu'à 5 semaines.

3°) Prélèvement, endormissement, observation

Afin d'observer les mouches, il est nécessaire de les endormir. L'étape difficile consiste à ouvrir le tube sans que les mouches s'envolent.
L'astuce utilisée pour tout transvasement est de taper le fond du tube sur un torchon plié afin de faire tomber les mouches sur la gélose (s'entraîner).
Lorsque plus aucune mouche ne vole, ôter très vite le bouchon et retourner le tube sur un entonnoir posé sur un autre tube ou un erlen vide (dit d'endormissement) ou un éthériseur (voir fonctionnement en annexe). Taper l'ensemble afin de faire passer les mouches au travers de l'entonnoir dans l'erlen d'endormissement ou l'éthériseur.
Pour les endormir, verser de l'éther sur un coton, le poser dans l'entonnoir et le recouvrir afin d'éviter l'évaporation (ou ôter l'entonnoir et boucher l'erlen avec le coton d'éther).
ATTENTION * les mouches non éthérisées sont très vives
* l'éther dissout les plastiques
Il est possible d'éthériser directement dans le tube de culture, mais les mouches endormies risquent alors de se coller les ailes sur la gélose humide et ne pourront donc plus être prélevées. Il faut alors coucher le tube durant l'action de l'éther.

OBSERVATION DES MOUCHES :
Une fois endormies ou mortes (en fonction du temps passé au contact de l'éther) verser les mouches sur une surface blanche (carreau de faïence ou, à défaut, papier).
Les manipuler délicatement avec un pinceau fin, plume ou pince pour les orienter afin de déterminer sexes et phénotypes.
Les mouches endormies peuvent se réveiller. Reéthérisez-les à nouveau.

Note : Observez la totalité de la descendance et pas seulement les premières mouches écloses, car les femelles naissent les premières et les différents phénotypes peuvent apparaître à des temps différents.

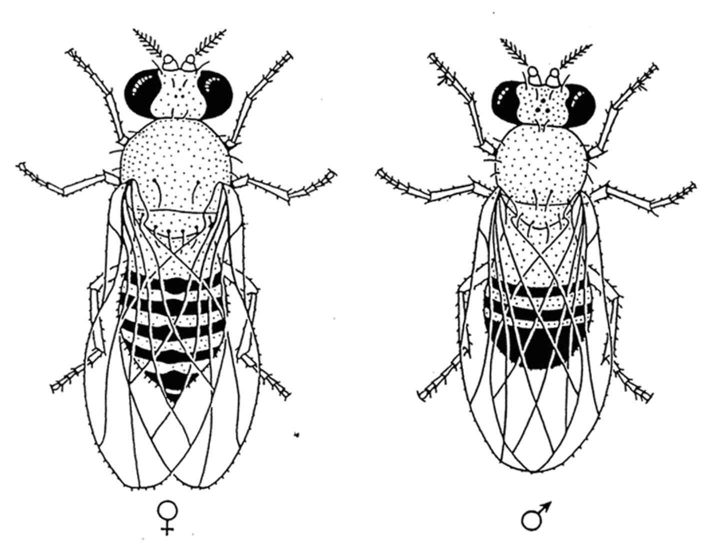
4°) Distinction entre les sexes

- Organes sexuels : voir dessin.
Le pénis est très coloré (rouge brun à brun foncé) alors que la plaque vaginale ne l'est pas.

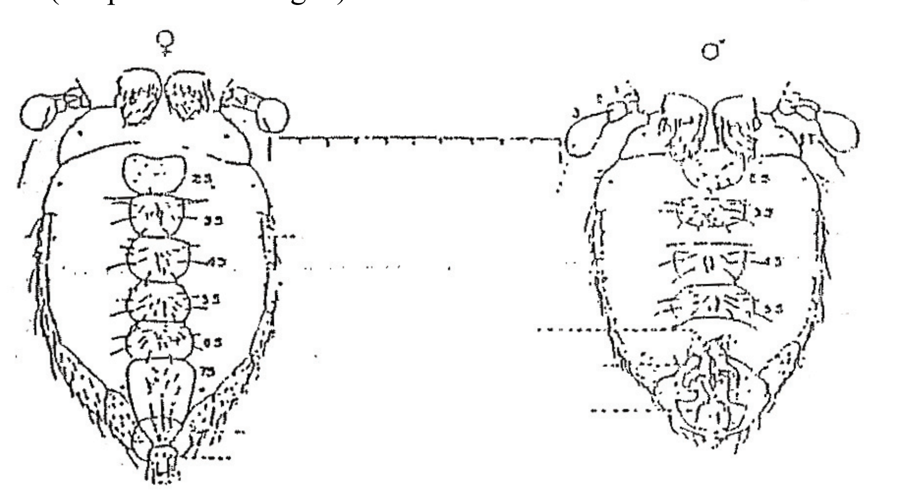
- Différence de taille : les femelles sont plus grandes que les mâles.

- Différence dans la forme et la couleur de l'abdomen. Vu dorsalement, l'abdomen de la femelle est de forme pointue, avec des segments terminaux gris assez clair. L'abdomen du mâle, plus arrondi, a des segments terminaux gris très foncé.

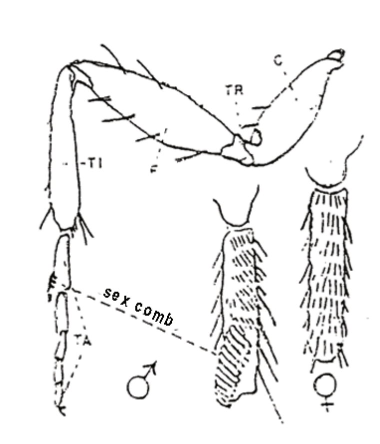
- Présence de « peignes sexuels » chez le mâle seulement. Il s'agit d'une touffe de poils noirs, au niveau métatarse – 1er article du tarse de la paire de pattes antérieures. Ce critère est particulièrement utile chaque fois que la différence de coloration ou de forme de l'abdomen entre mâles et femelles n'est pas clairement perceptible (individus à peine éclos, mutants de coloration du corps, mutants plus ou moins déformés.)



Mouches adultes
(D'après T.H. Morgan)



Abdomen (d'après Bridge)



Sex comb = peigne sexuel (dessins de Ferris)

GENETIQUE ET CYTOLOGIE

- *Drosophila melanogaster* possède 4 paires de chromosomes :

- X (ou I) / Y – femelle = XX (ou I – I)   mâle = X (ou I) Y

- II et III : longs

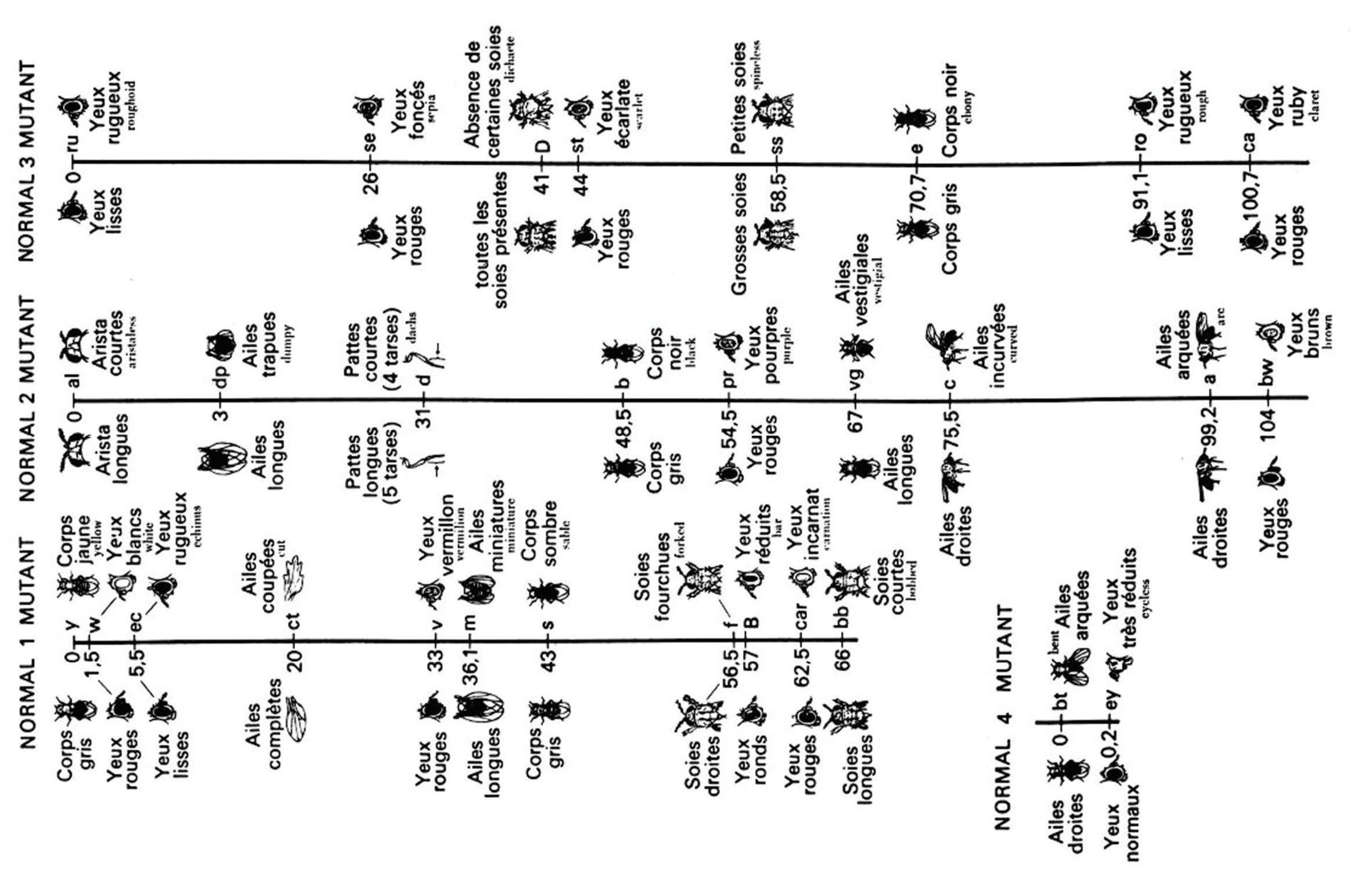
- IV : très petit

- De très nombreux gènes sont localisés sur les chromosomes X, II et III ; de très rares gènes sont localisés sur le chromosome IV. Quelques gènes seulement sont communs aux chromosomes X et Y (situés dans des régions proches du centromère).

- Il n'y a pas de crossing-over chez le mâle, quelle que soit la paire de chromosomes.

- Il y a polyténisation des chromosomes dans certains tissus (par exemple, glandes salivaires ou intestin de la larve) : d'où possibilité d'une bonne observation et de détermination de leur structure fine.

CARTE



2°) LE CROISEMENT

Il consiste à croiser des mâles d'une souche par des femelles vierges d'une autre souche.
La réussite du croisement réside dans le tri des mâles/femelles et l'isolement de femelles vierges. Si ces deux étapes sont correctement effectuées, il suffit d'avoir un bon milieu et de bonnes proportions mâles/femelles.

a) Proportions
Un tube de croisement doit contenir une quantité équivalente de mouches mâles et femelles, nous conseillons le nombre de 18 femelles (vierges) et 15 mâles par tube pour un résultat optimum.

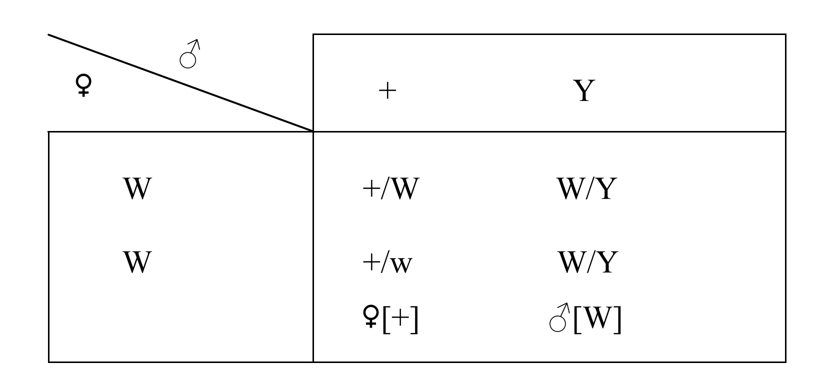
b) Importance de l'isolement de mouches vierges
Les femelles doivent être « vierges ». C'est là une des grosses difficultés puisque la femelle ne le reste que 6 heures après sa naissance si elle se trouve en présence de mâles.
Si la femelle n'est pas vierge, les résultats sont faussés.

Exemple :
On croise des femelles de phénotype [White] (souche White = yeux blanc) et de génotype W/W, elles portent une mutation sur la paire de chromosome sexuel X (homozygote récessif), avec des mâles de phénotype [Sauvage] (souche sauvage, yeux rouge brique) et de génotype +/Y.
Le chromosome Y est peu informatif (caractères sexuels).

On ne doit pas obtenir en génération F1 de femelles avec le phénotype [W], mais 100% de femelles avec le phénotype sauvage [+], yeux rouge brique.
Si cela n'est pas le cas, c'est à dire que le phénotype [W] est visible parmi les femelles nées en F1, nul doute que les femelles W/W n'étaient pas vierges au moment du croisement et qu'elles avaient auparavant été fécondées par des mâles W/Y.

<u>TABLEAU DE CROISEMENT</u> :

♀ W/W x ♂ +/Y



♀ \ ♂	+	Y
W	+/W	W/Y
W	+/w	W/Y
	♀[+]	♂[W]

Toutes les femelles auront le phénotype [sauvage = yeux rouge brique], car l'allèle White est récessif par rapport à l'allèle sauvage. Tous les mâles auront le phénotype [yeux blancs].

c) Importance du tri mâles/femelles
Prenons l'exemple de la mise en évidence d'une mutation sur un gène non lié au sexe : La mutation récessive vestigiale.
Si l'on croise des mâles Vg/Vg avec des femelles "vierges" +/+, on ne doit obtenir en F1 que des mouches de phénotype [+] (car l'allèle Vg est récessif par rapport à l'allèle +).
Si, par erreur lors du tri, on a introduit dans le tube de croisement des femelles Vg/Vg non vierges à la place de mâles Vg/Vg, le phénotype [Vg] apparaîtra alors en F1.

Il faut s'appliquer au tri des mouches selon les sexes et bien respecter le cycle des naissances pour récupérer les femelles vierges.

Un croisement est dit réussi lorsque 2 conditions sont réunies :
-L'observation des générations (F1, F2, …) présentent le (ou les) phénotype(s) conforme(s) au tableau de croisement selon la récessivité ou la dominance des caractères parentaux.
-Le comptage (en %) des différentes proportions phénotypiques, sur l'ensemble des naissances du tube, correspond aux pourcentages de ce même tableau de croisement.

d) Protocole pour l'obtention de mouches femelles "vierges":
Le matin de préférence, vider les tubes, c'est à dire s'assurer que les tubes ne contiennent plus aucune mouche déjà née, puis attendre par cycles de 5 heures les naissances. On considère alors que toutes les mouches nées pendant cette période n'ont pas atteint la maturité sexuelle. Cela nous donne donc la certitude d'obtenir des femelles vierges.
Les naissances récupérées (voir mode de prélèvement des mouches) puis endormies à l'éther (voir fonctionnement de notre éthériseur) sont ensuite mises sur un réceptacle (tel un carreau de faïence) et placées sous une loupe binoculaire. A l'aide d'un pinceau très fin on effectue le tri en fonction du sexe (voir distinction des sexes). Les femelles sélectionnées serviront aux croisements. Il faut bien entendu conserver les mâles déjà triés, pour un gain de temps s'ils sont destinés dans l'immédiat à un croisement, tel qu'un back-cross, en sachant que contrairement aux femelles ils peuvent être sélectionnés à tout moment.

Pour isoler un maximum de femelles « vierges » sur un minimum de cycles (vidage des tubes tous les 5 heures), nous recommandons de partir d'un nombre important de tubes au stade pupe-adulte (stade de l'éclosion) contenant la souche dont on veut isoler les femelles (vierges).
En effet, ceci permettra d'obtenir un meilleur rendement sur la quantité des naissances ainsi qu'un nombre réduit de cycles. De 4 à 10 tubes de souches semblent être une bonne base de départ.

Ne pas oublier de préalablement noter sur chaque tube au marqueur, ou avec une étiquette, le nom de la souche ou le type de croisement réalisé.
Une fois le croisement effectué, les tubes doivent être placés dans une étuve possédant un humidificateur, un éclairage en continu et une température comprise entre 23°et 26°.
Au bout de 4 à 5 jours, on remarque que le milieu de culture commence à être "grouillé" par la ponte et la croissance des larves. A ce moment on peut effectuer le repiquage des tubes, c'est à dire transvaser (avec un entonnoir) les mouches du croisement vers des tubes contenant du milieu nutritif neuf.
Les tubes ainsi vidés seront replacés dans l'étuve avec les mêmes conditions de T° que ceux nouvellement repiqués.
Au bout de quelques jours (au 7ème environ) les larves se dirigent vers le haut du tube en se fixant tout autour de la paroi pour finir leur maturation. Les éclosions débutent 10 jours après le croisement (obtention de la génération F1).
Toutes les naissances peuvent être étalées sur 3 jours, donc bien attendre que tout soit né avant le comptage pour l'analyse et l'interprétation.

EXEMPLE DE PLANNING POUR LA REALISATION D UN CROISEMENT

* Réception des tubes contenant les futurs parents (au stade larvaire) **J-7**

  Isolement des mâles et des femelles vierges

* Réalisation du croisement **J0**

  Les mouches pondent

* Enlever les parents pour éviter le mélange de génération **J+5 à J+7**
* Naissance de la génération F1 **J+12 à J+15**
* Pour faire la génération F2, il suffit de laisser les mouches issues de F1 ensemble dans un nouveau milieu. A ce stade, on n'a pas besoin de mouches vierges.

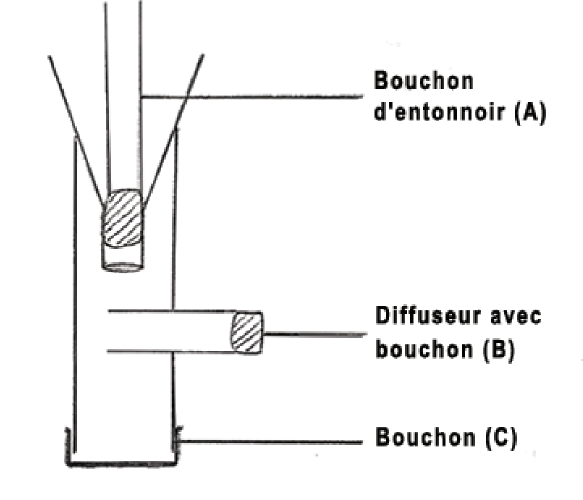
  Les mouches pondent

* Enlever les parents pour éviter le mélange de génération **J+17 à J+20**
* Naissance de la génération F2 **J+24 à J+30**

SIGNAUX D'ALERTE :

-lorsque qu'un tube sent mauvais c'est souvent le signe d'une contamination bactérienne du milieu, cela arrive de temps en temps, il suffit de repiquer le tube et de le jeter.
-le milieu de culture se détache de sa base (espace entre le milieu et la paroi du tube), cela signifie une déshydratation du milieu (importance de l'humidificateur). Un repiquage est alors nécessaire car les mouches par instinct de survie limitent leur ponte lorsque les milieux ne sont pas favorables à la survie des larves.
-un phénotype différent de celui de la souche pure est observé dans le tube. La souche n'est plus pure, elle a peut-être été en contact avec une souche différente. Il faut alors jeter l'ensemble du tube pour ne pas prendre le risque de perdre la souche pure lors des repiquages avec d'autres tubes.

ETHERISEUR SORDALAB



COMPOSITION :

Par 1 :
- 1 éthériseur
- 1 bouchon d'entonnoir (A)
- 1 compte-gouttes

Par 10 :
- 10 éthériseurs
- 10 bouchons d'entonnoirs
- 2 compte-gouttes

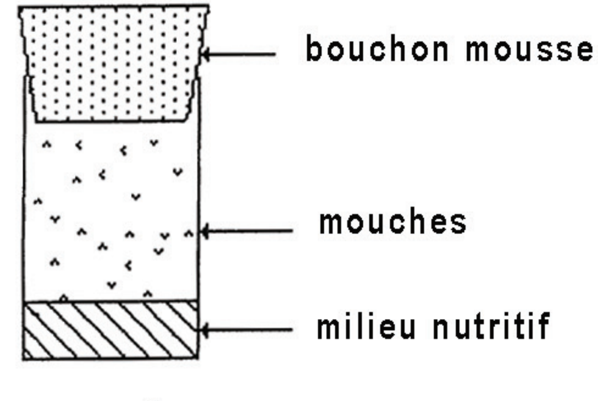
MODE D'EMPLOI :

1) Préparation de l'éthériseur :

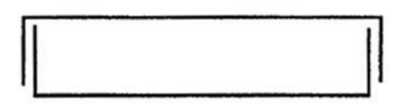
Son étanchéité lui confère une utilisation possible pendant une dizaine d'heures. Il est donc conseillé de préparer à l'avance les éthériseurs sous une hotte ou dans une pièce bien ventilée.
Poser le bouchon (A) (côté plastique) dans l'entonnoir, en tournant ½ tour dans le sens des aiguilles d'une montre. Un trait d'étanchéité continu est formé entre l'entonnoir et son bouchon.
Oter le bouchon du tube diffuseur (B).
Prélever entre 0,25 et 0,5ml de flynap à l'aide d'un compte-goutte (1 ou 2 graduations) et les mettre dans le tube diffuseur. Reboucher aussitôt.
L'éthériseur est prêt à être utilisé.
Le compte-goutte peut être remplacé par une seringue de 5 ou 10ml.
Ne pas utiliser de pipette.

2) Utilisation :

Oter le bouchon (A) de l'éthériseur au dernier moment puis aussitôt taper latéralement avec une main sur le tube de mouches à endormir pour les faire descendre au fond du tube.
Oter le bouchon des mouches et retourner le tube sur l'entonnoir de l'éthériseur.
Taper verticalement l'ensemble éthériseur-tube retourné sur un torchon ou un cahier pour assourdir les chocs.
Lorsque toutes les mouches sont tombées, reboucher l'éthériseur avec le bouchon (A) et continuer à taper doucement l'éthériseur, 2-3 fois afin de faire tomber les mouches.
Observer le moment où plus aucune mouche ne se déplace. Attendre 30 à 50 secondes après ce moment puis en maintenant l'éthériseur vertical (entonnoir en haut) dévisser le bouchon (C) contenant toutes les mouches endormies.
Poser aussitôt l'éthériseur sur la paillasse afin que le flynap ne se diffuse pas dans la pièce.
Transvaser les mouches endormies sur un carré de faïence ou une autre surface d'observation.
Reboucher aussitôt l'éthériseur.
Réalisées vite et correctement, ces opérations permettent une utilisation de l'éthériseur pendant plusieurs heures avec une perte très limitée de flynap.



LE TUBE D'ÉLEVAGE



LA BOÎTE D'OBSERVATION

bouchon de bois

entonnoir

tube latéral

tube plastique
transparent

bouchon vissant

L'ÉTHÉRISEUR

tube d'élevage renversé

entonnoir

coton imbibé de Flynap

bouchon à vis

L'ENDORMISSEMENT
DES DROSOPHILES